

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-94790

(43)公開日 平成11年(1999)4月9日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 27/327

識別記号

F I

G 0 1 N 27/30

3 5 3 F

3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-267812

(22)出願日 平成9年(1997)9月12日

(71)出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72)発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ

オーケー株式会社内

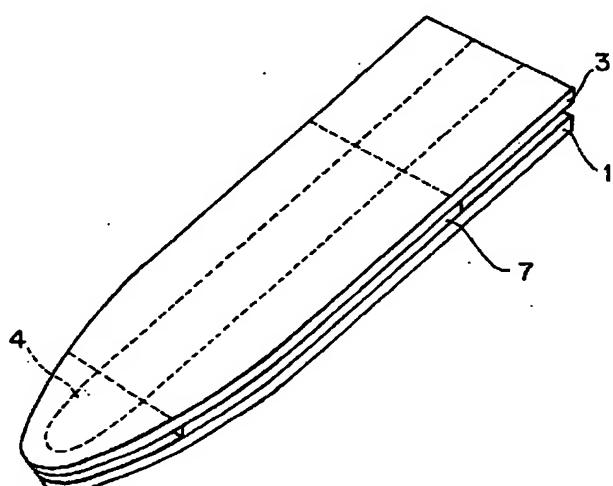
(74)代理人 弁理士 吉田 俊夫

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサにおいて、製作工程を容易化し、その製作コストを低減せしめたものを提供する。

【解決手段】 酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるように配置したバイオセンサにおいて、これらの各電極を内側に設けた各基板を接着剤層を介して接着せしめる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるよう配置したバイオセンサにおいて、これらの各電極を内側に設けた各基板を接着剤層を介して接着せしめてなるバイオセンサ。

【請求項2】 接着剤層の形成が両面接着テープによって行われる請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 接着剤層が一方の基板上に塗布された接着剤によって形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項4】 接着剤層が両方の基板上に塗布された接着剤によって形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項5】 電極形成基板と接着剤層との間に絶縁層が形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項6】 各基板の一端側がそれぞれテーパー状に形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項7】 各基板の一端側がそれぞれ凸部形状に形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項8】 作用極上に酸化還元酵素-電子伝達体混合物層が形成された請求項1記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化還元酵素を電極上に固定化したバイオセンサに関する。更に詳しくは、酸化還元酵素を電極上に固定化し、作用極と対極とを対面構造をとるよう配置したバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】グルコースオキシダーゼを作用極上に固定化せしめた従来のグルコースバイオセンサにあっては、作用極以外に対極あるいは対極と参照極とが平面状基板の同一面上に配置されている。このような電極配置のグルコースバイオセンサにおいて、測定サンプルを電極に接触させるには2つの方法がとられている。

【0003】その第1の方法は、直接測定サンプルを電極上に滴下する方法であるが、この方法ではサンプリングから滴下迄手間と時間を要するという問題がある。その第2の方法は、電極基板の上に溝を有するスペーサーを配置し、その上に更に空気孔を設けたカバーを配置した構造のものを用いるという方法である。この方法では、測定サンプルが直接電極上に導かれるため手間や時間がとられないという利点がある反面、空気孔の設置を必要とするなど、素子製作において煩雑な工程を必要とするという欠点を有している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本出願人は先に、グルコースオキシダーゼを電極上に固定化せしめたグルコースバイオセンサであって、製作および測定が容易であり、從って使い捨てグルコースバイオセンサとして好適なものとして、作用極および対極とを対面構造をとるよう配置し、より具体的には作用極を配置した基

板と対極を配置した基板との間にスペーサーを介在させることにより対面構造をとるよう配置したものを作成している(特願平8-175585号)。

【0005】しかしながら、作用極-対極間の対面構造を実現するために、これらの電極を配置した基板の間にスペーサーを介在させることは、製作工程が煩雑になるばかりではなく、コストアップにもつながるという問題がみられた。

【0006】本発明の目的は、酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるよう配置したバイオセンサにおいて、製作工程を容易化し、その製作コストを低減せしめたものを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを対面構造をとるよう配置したバイオセンサにおいて、これらの各電極を内側に設けた各基板を接着剤層を介して接着せしめることによって達成される。

【0008】

【発明の実施の形態】図1は、本発明に係るバイオセンサの一態様の斜視図であり、図2は、作用極を設けた基板の平面図である。基板1には作用極2が、また基板3にはその対極4が設けられており、基板テーパー部8側の作用極2上には酸化還元酵素-電子伝達体混合物層5が形成されている。そして、作用極2の混合物層5およびリード部6を除く部分には、接着剤層7が形成されている。

【0009】基板としては、ポリエチレンテレフタレートによって代表されるプラスチック、生分解性プラスチック、ガラス、セラミックス、紙等の絶縁性基板であって、フィルム、シートまたは板状のものが用いられる。作用極、対極およびこれらのリード部の形成は、カーボン、銀、金等のペーストを用いるスクリーン印刷法あるいはカーボン箔、パラジウム箔を用いる箔付け法などによって行われ、これらは不織布などによって研磨処理された上で用いられることが好ましい。更に、必要に応じて作用極側あるいは対極側の基板上に参照極を配置することもでき、参照極の形成は、スクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法などによって一旦銀電極を形成させた後、それを塩化銀化する方法などによって行われる。

【0010】固定化せしめる酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、ピルビル酸オキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ピルビル酸デヒドロゲナーゼ等があり、これらによってグルコース、乳酸、アルコール、ピルビン酸、抗原等の有機物質、塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、水素イオン、溶存酸素等の電解質や無機物質の濃度測定が可能であるが、最も一般的に用いられるグルコースオキシダーゼによるグルコース濃度の測定法について、以

下では塗布乾燥法（吸着法）を例にして説明することとする。尚、塗布乾燥法以外に、共有結合法、イオン結合法、架橋法などが、グルコースオキシダーゼの固定化方法として用いられる。

【0011】グルコースオキシダーゼは、一般には作用極上に固定化せしめるが、グルコースオキシダーゼは測定サンプルである水溶液中に溶解され、作用極上で反応するようになるため、作用極周辺、対極またはその周辺などに固定化させていてもよい。

【0012】グルコースオキシダーゼの電極への固定化、好ましくは作用極上への固定化は、以下に列挙される如く、グルコースオキシダーゼ単体としてばかりではなく、電子伝達体（メディエータ）およびアルブミンの少なくとも一種を添加した混合物層としても形成される。

(1) グルコースオキシダーゼ層

(2) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体混合物層

(3) グルコースオキシダーゼ-アルブミン混合物層

(4) グルコースオキシダーゼ-電子伝達体-アルブミン混合物層

【0013】グルコースオキシダーゼ層(1)の形成は、グルコースオキシダーゼ(GOD)を、例えば165800単位/gのGODの場合その約1~50mg、好ましくは約5~30mgを蒸留水またはクエン酸緩衝液（約0.05~0.2M濃度）1mlに溶解させ、その溶液(GOD溶液)約0.5~10μl、好ましくは約1~3μlを滴下法、スピンドル法などによって滴下し、室温で乾燥させて、膜厚約1~200μm、好ましくは約50~150μmの層を形成させることにより行われる。

【0014】混合物層(2)~(4)の場合にも、この場合と同様の形成方法が行われ、ただしGOD水溶液中に更に次の各成分が添加された溶液が用いられる。

混合物層(2)の場合：フェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン等が電子伝達体として用いられ、フェリシアン化カリウムにあっては約1~100mg、好ましくは約30~60mgを、パラベンゾキノンにあっては約1~200mg、好ましくは約50~150mgを更に添加した溶液を使用

混合物層(3)の場合：牛血清アルブミンを約1~100mg、好ましくは約5~30mgを更に添加した溶液を使用

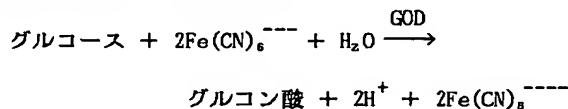
混合物層(4)の場合：混合物層(2)の形成に用いられた量の電子伝達体および混合物層(3)の形成に用いられた量の牛血清アルブミンを更に添加した溶液を使用

【0015】添加された電子伝達体は下記の如く作用し、またアルブミンやクエン酸緩衝液の添加は、測定液（グルコース水溶液）のpH変化に対して出力誤差を抑制し、バラツキのより少ない測定結果を与える。また、ノニオン系界面活性剤を電極付近に塗布することにより、測定液の吸引、それに引続く混合層の溶解に寄与し、測定精度を向上させるという効果も得られる。

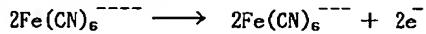
【0016】グルコースがGODの作用により酵素の存在下で酸化されてグルコノラクトンを生成させ、そのとき発生するH₂O₂を作用極上で酸化し、その際の酸化電流値

を測定することにより、グルコース濃度を間接的に求めることの方法は周知である。しかしながら、測定液が水で希釈されない原液サンプルの場合には、酸化反応が溶存酸素濃度に律速されるため、グルコース濃度が約100mg/dl程度迄しか直線検量範囲を示さない。

【0017】そこで、溶液中濃度が有限である酸素の代わりに、電子伝達体がGODと共に用いられる。メディエータがフェリシアン化カリウムK₃Fe(CN)₆の場合、この反応は次のように進行する。



この際発生したフェロシアニンイオンは、作用極で酸化されて酸化電流を生ずる。



【0018】また、メディエータとしてフェリシアン化カリウムの代わりにパラベンゾキノンを用いた場合には、GOD存在下でのグルコースとパラベンゾキノンとの反応でヒドロキノンが生成し、この際生成したヒドロキノンは作用極で酸化され、酸化電流を生ずるのでその値が測定される。



【0019】一方、対極上には、特に何も固定化しなくとも使用し得るが、アルブミンおよび電子伝達体の少なくとも一種からなる混合物層を形成させて用いてよい。この場合には、作用極上のみに混合物層を設けた場合にみられる測定液による混合物層の溶解、拡散に生じ勝ちな傾きがみられなくなる利点があり、測定精度も上昇する。

【0020】なお、固定化せしめたGODへの測定サンプル液の接触を円滑に行わしめるために、作用極上、対極上、作用極周辺、対極周辺、作用極上およびその周辺、対極上およびその周辺などに、ノニオン系界面活性剤を塗布したり、不織布、口紙等の含浸促進剤をスペーサ間隙を利用して接着させるなどの手段を適用することも可能である。

【0021】作用極を設けた基板および対極を設けた基板の接着は、一般に両面接着不織布などの両面接着テープによって行われる。形成された接着剤層の厚さは、当然作用極および対極が接触しない間隔を保ち得るものでなければならず、約100~500μm（約0.1~0.5mm）、好ましくは約150~350μm（約0.15~0.35mm）に設定される。

【0022】両面接着テープの代りに、アクリル樹脂等からなる等からなる接着剤を一方または両方の基板上の所定位置にスクリーン印刷法で塗布し、これら両基板を上記間隔を保った状態で接着させることもできる。更に、接着剤層の下には、その長さより長い長さで、熱硬化性ポリエステル樹脂等からなる絶縁膜9を、約5~25μmの厚さで設けることもできる[図3参照]。

【0023】また、作用極または対極が設けられる基板の一端側8は、図1に示されるように、とがった形状のテーぺー状とし、それによって測定液が微小量ではあってもそれを直接採取することができ、従って電極との接触も速やかに行われるようになるが、図4に示されるように、電極が設けられる基板の一端側をテーぺー状とはせず、凸部形状10とすることもできる。

【0024】グルコース濃度の測定は、このようにして作製されたグルコースバイオセンサの両電極間に形成される空間に、所定濃度のグルコース水溶液約0.1~10μlを吸引して電極と接触させ、約1~120秒間程度反応させた後、そこに約0.05~1.5V、好ましくは約0.4~1.1Vの電圧を印加し、印加0.5~50秒後の電流値を測定するポテンシャルステップクロノアンペロメトリー法によって行われる。測定には、ポテンショガルバノスタットおよびファンクションジェネレータが用いられる。

【0025】

【発明の効果】酸化還元酵素を固定化した作用極とその対極とを、これらの各電極を内側に設けた各基板を接着剤層を介して接着させることにより、対面構造をとるよう配置した本発明のバイオセンサは、製作が容易であり、またその製作コストも低減される。

【0026】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

【0027】実施例1

一端側がテーぺー状のポリエチレンテレフタレート基板2枚を用意し、それぞれの基板上にカーボン製電極をスクリーン印刷法によって、膜厚10μmで形成させた。その一方のカーボン製電極上に、水1mlにグルコースオキシダーゼ(165800U/g)10mgおよびフェリシアン化カリウム48mgよりなる混合液(ドープ液)を1.5μl滴下して室温条件下で乾燥させ、グルコースオキシダーゼ-フェリシアン化カリウム混合物層(厚さ約100μm)を形成させて作用極とした。

【0028】このようにして得られた混合物層形成作用極を設けた基板Aと対極を設けた基板Bとを用い、下記の如き種々の態様で両面接着テープ(日東電工製品500番:厚さ160μm)を接着剤層として貼り合せた。

- (1)混合物層形成作用極を設けた基板Aと対極を設けた基板Bとを、基板A側に設けた接着剤層によって貼り合せたもの
- (2)混合物層形成作用極を設けた基板Aと基板Bとを、基板A側に設けた接着剤層によって貼り合せたもの
- (3)混合物層形成作用極を設けた基板A同志を接着剤層によって貼り合せたもの(一方が対極となる)
- (4)上記(1)で各電極と各基板との間に絶縁層(熱硬化性ポリエステル樹脂を用いたスクリーン印刷法で膜厚20μmで形成)を設けたもの
- (5)上記(1)で各電極が不織布で研磨処理されたもの

【0029】これらのグルコースバイオセンサに、濃度

250mg/dlのグルコース水溶液(pH5.0)1μlを吸引させ、20秒間静置した後、作用極-対極間に0.9Vの電圧を印加し、印加10秒後の電流値を10回測定した。測定には、ポテンショガルバノスタット(北斗電工製HA-501)およびファンクションジェネレータ(同社製HB-104)が用いられた。その測定値からCV値(平均値に対する標準偏差の割合)を算出すると、それぞれ(1)4.5%、(2)4.3%、(3)4.1%、(4)4.4%、(5)4.0%という値が得られた。なお、センサは、一試料毎に使い捨てとした。また、グルコース濃度を種々変更して測定を行ったところ、0~1000mg/dlの範囲内で直線性が得られた。

【0030】実施例2

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液中にアルブミン10mgを添加したものが用いられた。CV値は、4.8%であった。

【0031】実施例3

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液として水の代りに0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を用いて調製されたものが用いられた。CV値は、4.7%であった。

【0032】実施例4

実施例1の(1)で、pHを7.0に調整したグルコース水溶液を用い、またドープ液中にアルブミン10mgを添加すると共に、水の代りに0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を用いて調製されたものが用いられた。CV値は、4.6%であった。

【0033】実施例5

実施例4で、ドープ液中に更にノニオン系界面活性剤(UC0社製品トリトンX-100)を0.5重量%の濃度で添加したものが用いられた。CV値は、4.5%であった。

【0034】実施例6

実施例1の(1)で、界面活性剤(トリトンX-100)の0.5重量%水溶液を作用極の周辺に塗布し、乾燥させたものが用いられた。CV値は、4.4%であった。

【0035】なお、実施例2~6の各グルコースバイオセンサについても、グルコース濃度0~1000mg/dlの範囲内で直線性が得られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るバイオセンサの一態様の斜視図である。

【図2】作用極を設けた基板の平面図である。

【図3】絶縁層を設けた基板の平面図である。

【図4】先端部を凸部形状とした基板の平面図である。

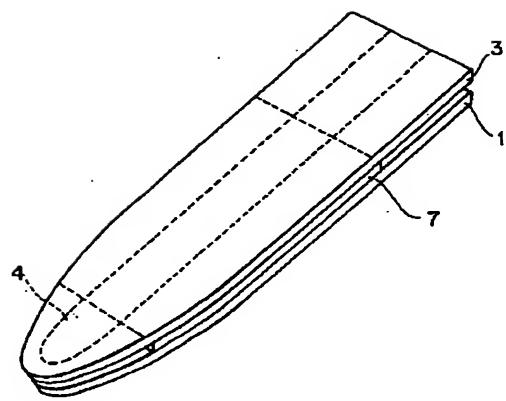
【符号の説明】

- 1 作用極側基板
- 2 作用極
- 3 対極側基板
- 4 対極
- 5 酸化還元酵素-電子伝達体混合物層
- 6 リード部
- 7 接着剤層

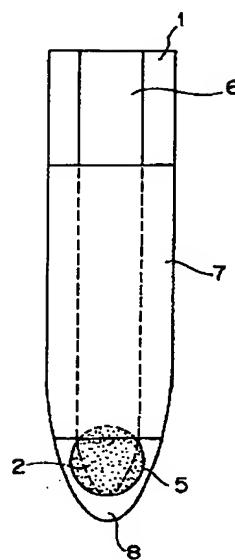
8 基板テーパー部
9 絶縁膜

10 凸部形状

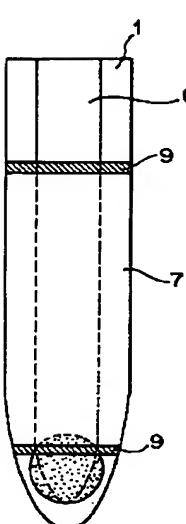
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

